

## 人CEACAM8/CD66b双抗夹心ELISA检测试剂盒

请在实验前仔细阅读本说明书

产品货号: KE00368  
规格: 96T  
灵敏度: 5.2 pg/mL  
检测范围: 46.88-3000 pg/mL  
用途: 此试剂盒用于定量检测血清、血浆以及细胞上清中的人CEACAM8/CD66b浓度

本产品仅用于科学研究，不适用于临床诊断

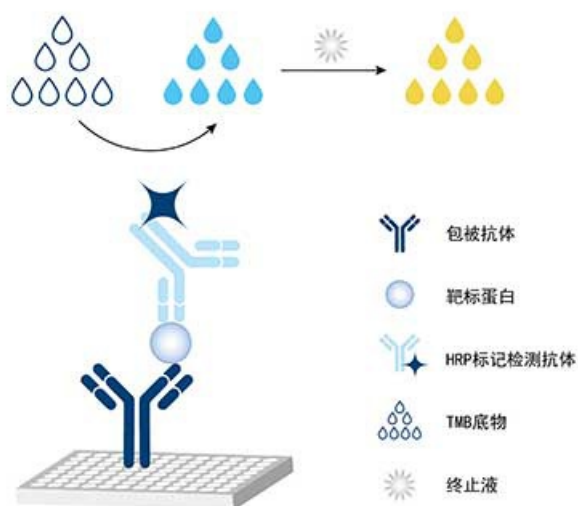
## 目录

|            |   |
|------------|---|
| 一：背景信息     | 3 |
| 二：检测原理     | 3 |
| 三：需自备的实验器材 | 3 |
| 四：试剂盒组分及储存 | 4 |
| 五：实验注意事项   | 4 |
| 六：样本准备     | 4 |
| 七：试剂准备     | 5 |
| 八：实验步骤     | 6 |
| 九：实验参数     | 7 |
| 9.1 参考标曲图  | 7 |
| 9.2 精密度    | 7 |
| 9.3 加标回收率  | 7 |
| 9.4 样本值    | 8 |
| 9.5 灵敏度    | 8 |
| 9.6 线性     | 8 |
| 9.7 特异性    | 8 |
| 十：参考文献     | 9 |

## 一：背景信息

在人中性粒细胞中鉴定出一种糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定糖蛋白，癌胚抗原 (CEA) 相关细胞黏附分子 8 (CEACAM8)，也称为 CD66b、NCA-95 和 CD67。它仅由粒细胞表达，其中 95% 是多形核中性粒细胞 (PMN)。CEACAM8 是中性粒细胞上的细胞粘附蛋白，属于人类癌胚抗原家族。CEA 家族成员被认为在体外具有细胞间黏附分子的作用。CEACAM8 已被证明黏附于密切相关的分子 CEACAM6 (NCA-50/90; CD66c)，这表明 CEACAM8 在体内粒细胞之间或粒细胞与表达 CEACAM6 的上皮细胞之间的相互作用中发挥作用。

## 二：检测原理



### ◀双抗夹心模式图 (检测抗体直标HRP)

按操作顺序形成抗体夹心结构后，加入TMB底物，板孔液体由无色变成蓝色，再加入终止液液体变为黄色后进行吸光度值测定。

## 三：需自备的实验器材

- 3.1 酶标仪 (可读取450 nm和630 nm双波长);
- 3.2 高精度移液器及一次性移液器枪头;
- 3.3 洗板机 (亦可手动洗板);
- 3.4 EP管 (用于稀释标准品及样本);
- 3.5 吸水毛巾或滤纸 (用于拍干);
- 3.6 烧杯和量筒;
- 3.7 用于ELISA实验的数据分析的统计拟合软件 (推荐四参数拟合方法), 如: Origin, ELISA Calc等。

## 四：试剂盒组分及储存

| 英文名称                                                                                               | 中文名称                   | 规格        | 数量  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------|-----|
| Microplate                                                                                         | 预包被酶标板 - 96 孔板         | 8孔 × 12条  | 1 块 |
| Protein standard                                                                                   | 标准品 - 冻干粉状 *           | 6000 pg/瓶 | 2 瓶 |
| Detection antibody, HRP-conjugated (100×)                                                          | HRP标记检测抗体浓缩液 (100×) ** | 120 µL/支  | 1 支 |
| Sample Diluent PT 3                                                                                | 样本稀释液 PT 3             | 30 mL/瓶   | 1 瓶 |
| Detection Diluent                                                                                  | 抗体稀释液                  | 30 mL/瓶   | 1 瓶 |
| Wash Buffer Concentrate (20×)                                                                      | 浓缩洗涤液 (20×)            | 30 mL/瓶   | 1 瓶 |
| Tetramethylbenzidine Substrate (TMB)                                                               | 显色底物 TMB               | 12 mL/瓶   | 1 瓶 |
| Stop Solution                                                                                      | 终止液                    | 12 mL/瓶   | 1 瓶 |
| Plate Cover Seals                                                                                  | 封板膜                    |           | 4 张 |
| <b>储存条件：</b><br>1：未开启试剂盒可在2-8℃条件下存放6个月或者在-20℃条件下存放1年<br>2：已开启试剂盒可在2-8℃存放7天<br>3：每次实验均使用新的标准品,使用后丢弃 |                        |           |     |

\* 使用对应的样本稀释液对标准品进行复溶，复溶过程避免产生气泡

\*\* 开盖前请离心

## 五：实验注意事项

5.1 避免皮肤接触终止液以及TMB 显色液；

5.2 在实验过程中，注意穿戴个人防护装备，如实验服，手套，口罩和护目镜；

5.3 请勿将不同批次的试剂进行混用，过期产品请勿使用；

5.4 在使用自动洗板机时，板孔加入洗涤液之后，设置30秒的浸泡程序，以提高分析的精确度。

## 六：样本准备

6.1 血清：全血标本室温凝固 30 min后1000×g 离心15 min，取上清立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

6.2 血浆：可用EDTA、肝素或柠檬酸盐作为抗凝剂，标本采集后1000×g 离心15 min，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融  
(注意：标本溶血会影响检测结果，因此溶血标本不宜进行检测)。

6.3 细胞上清：收集细胞培养液，500×g 离心5 min取上清，立即使用或分装后-20℃存放，避免反复冻融。

七：试剂准备

7.1 洗涤液（1×）：

如果洗涤液（20×）有晶体析出，37℃加热至晶体全部溶解。按1:20稀释倍数进行稀释：如取30 mL 浓缩洗涤液（20×），加入570 mL 超纯水或去离子水，得到洗涤液（1×）。

7.2 HRP标记检测抗体（1×）：

开盖前瞬时离心，按1:100比例进行稀释，稀释前根据预先计算实验所需的总量配制（100 μL/孔），实际配制时应多配制0.1-0.2 mL。如10 μL HRP标记检测抗体浓缩液（100×）加 990μL 抗体稀释液进行配制，轻轻混匀。

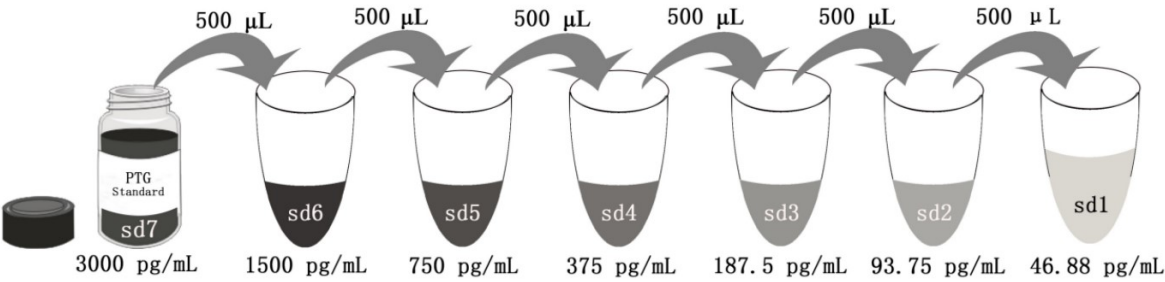
7.3 待检测样本：

不同的样本使用相应的样本稀释液进行稀释，如果样本检测值超过标曲最高范围，可将样本进行一定的稀释后再进行实验，使样本的检测值处于标曲范围内，不同样本的稀释倍数需自行优化。

稀释比推荐如下：人血清、血浆以及细胞上清样本1:2或1:4稀释；样品采集、处理和储存的差异可能导致测值的改变。

7.4 梯度稀释的标准品：

使用2 mL PT 3 样本稀释液复溶标准品，具体操作如下：



|                                                   |         |        |        |        |        |        |        |
|---------------------------------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Add # μL of Standard diluted in the previous step | —       | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
| # μL of Sample Diluent PT 3                       | 2000 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL | 500 μL |
|                                                   | "sd7"   | "sd6"  | "sd5"  | "sd4"  | "sd3"  | "sd2"  | "sd1"  |

## 八：实验步骤

实验前，需要将所需试剂在室温平衡20-30min（HRP标记检测抗体浓缩液不需要平衡室温，即用即取）；在进行标准品、样本以及不同试剂加样时，更换枪头，避免接触微孔板的内表面，不同的试剂，使用不同的加样槽。

8.1 根据实验用量，取出需要用到的酶标板条，剩余板条加入干燥剂放入铝箔袋密封后存放于4°C，并于一周之内用完；

8.2 加样，分别设零孔、标准孔、待测样本孔。零孔加样本稀释液100  $\mu$ L，余孔分别加梯度稀释的标准品或待测样本100  $\mu$ L/孔，注意不要产生气泡（建议标准品和样本都做复孔，尽量避免实验误差，确保上样不间断，5-10 min完成加样）；

8.3 酶标板盖上覆膜，37°C孵育2 h；

8.4 洗涤

1) 揭开封板膜（动作轻柔，避免动作过大导致液体溢出串孔），弃液体，拍干；

2) 洗涤液（1 $\times$ ）洗涤板条，每孔350-400  $\mu$ L，洗涤后，甩掉液体拍干板条，重复此步骤4次，避免异物进入板孔以及板条干燥；

8.5 每孔加100  $\mu$ L HRP标记检测抗体（1 $\times$ ）（参照试剂准备部分7.2），盖上封板膜，37°C孵育40 min；

8.6 重复步骤8.4；

8.7 显色：每孔加TMB显色液100  $\mu$ L，37°C避光显色 15-20 min（如果颜色偏浅，可适当延长显色时间，不超过30 min；保持显色底物始终处于避光状态，显色底物在加样前应是无色透明，如有变色，请勿使用）；

8.8 终止：每孔加终止液100  $\mu$ L，蓝色变黄色。终止液与TMB显色液的加样顺序一致；（注意：眼睛和皮肤避免接触终止液）

8.9 读数：以630 nm为校正波长，用酶标仪在450 nm波长测量各孔的光密度（OD值）。加入终止液后5 min内进行读数，若无630 nm波长，也可直接使用450 nm波长读数；

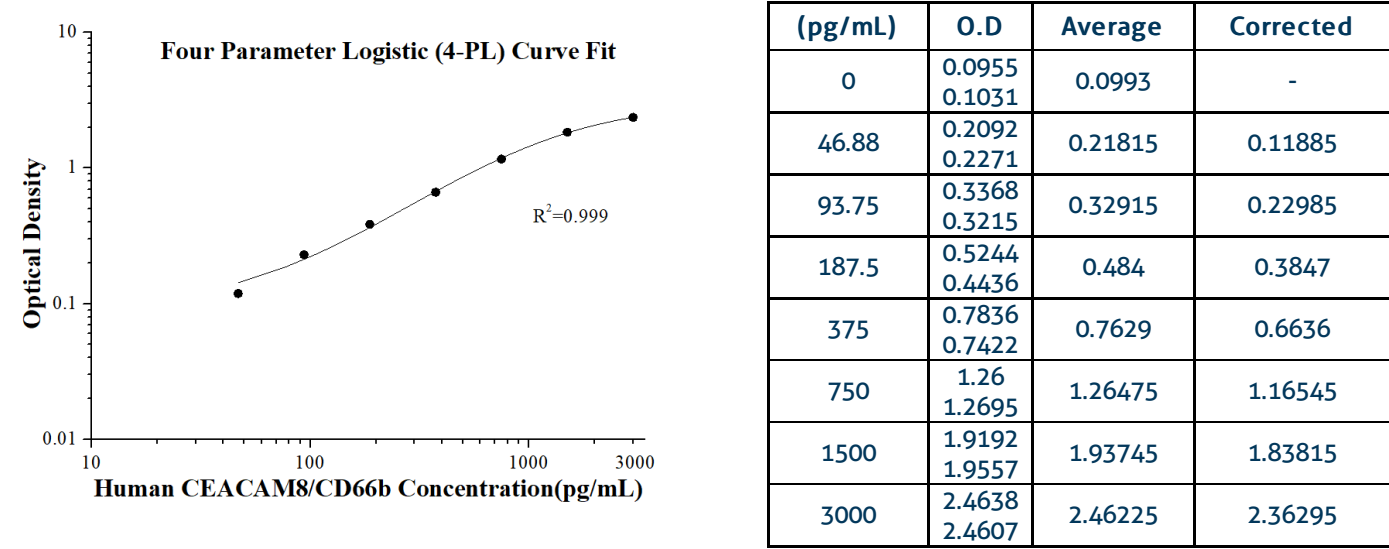
8.10 数据分析：每个标准品和样本的OD值需减去零孔的OD值，设置复孔，取其平均值。以标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，使用专业软件（如Origin、ELISACalc等）进行四参数拟合（4-PL），根据样本的OD值由标准曲线推算出拟合浓度，乘以稀释倍数得到样本的实测浓度。

### 操作流程如下：

| 步骤 | 试剂                                           | 体积          | 孵育时间     | 洗涤次数  | 孵育温度         |
|----|----------------------------------------------|-------------|----------|-------|--------------|
| 1  | 标准品或样本                                       | 100 $\mu$ L | 120 分钟   | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 2  | HRP标记检测抗体（1 $\times$ ）                       | 100 $\mu$ L | 40 分钟    | 4 次   | 覆膜后37°C孵育    |
| 3  | 显色 TMB                                       | 100 $\mu$ L | 15-20 分钟 | 不需要洗涤 | 覆膜后37°C孵育，避光 |
| 4  | 终止液                                          | 100 $\mu$ L | 0 分钟     | 不需要洗涤 | -            |
| 5  | 加入终止液后以630 nm为校正波长，在450 nm处测量OD值，此过程建议不超过5分钟 |             |          |       |              |

九：实验参数

9.1 参考标曲图



9.2 精密度

板内精密度：3个不同浓度的样本在板内重复测定 20次；

板间精密度：3个不同浓度的样本在板间重复测定 24次。

| 板内精密度 (CV内) |    |             |      |         | 板间精密度 (CV 间) |    |             |       |         |
|-------------|----|-------------|------|---------|--------------|----|-------------|-------|---------|
| 样本          | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差  | 变异系数CV% | 样本           | 数量 | 平均值 (pg/mL) | 标准差   | 变异系数CV% |
| 1           | 20 | 1,597.9     | 72.9 | 4.6     | 1            | 24 | 1,683.8     | 113.4 | 6.7     |
| 2           | 20 | 350.9       | 25.1 | 7.2     | 2            | 24 | 378.7       | 36.6  | 9.7     |
| 3           | 20 | 87.7        | 7.0  | 8.0     | 3            | 24 | 17.8        | 1.8   | 9.9     |

9.3 加标回收率

样本稀释后，在标曲范围内选择高、中、低3个浓度，进行人CEACAM8/CD66b的加标回收率实验，结果如下：

| 样本类型 | 稀释倍数 | 平均值 (%) | 范围 (%) |
|------|------|---------|--------|
| 人血清  | 1:8  | 83      | 77-92  |
| 细胞上清 | 1:4  | 101     | 98-107 |

## 9.4 样本值

人血清- 应用本试剂盒，检测人血清中人CEACAM8/CD66b的浓度。

| 样本类型         | 均值 (pg/mL) | 范围 (pg/mL)   |
|--------------|------------|--------------|
| 人血清样本 (n=16) | 820.7      | 282.8-2350.0 |

细胞上清 - 用含有10% 胎牛血清、5μM β-巯基乙醇、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养基培养人外周血单个核细胞( $1 \times 10^6$  cells/mL)。用10 μg/mL 植物血凝素PHA 刺激细胞3天。收集细胞上清，检测人CEACAM8/CD66b的浓度。

| 刺激条件 | 3天 (pg/mL) |
|------|------------|
| 未刺激  | 4.6        |
| 刺激   | 24.0       |

## 9.5 灵敏度

用20个重复的零孔平均OD值加上两倍标准差得到的OD值带入标准曲线拟合出对应的浓度值，此试剂盒中人CEACAM8/CD66b的灵敏度为5.2 pg/mL。

## 9.6 线性

细胞上清加入高浓度的人CEACAM8/CD66b蛋白，梯度稀释后检测样本加标线性，人血清用对应样本稀释液稀释样本，使稀释后的检测值处于标曲范围内，线性数据如下：

|      |        | 人血清     | 细胞上清    |
|------|--------|---------|---------|
| 1:2  | 均值 (%) | 100     | 91      |
|      | 范围 (%) | -       | 90-92   |
| 1:4  | 均值 (%) | 107     | 93      |
|      | 范围 (%) | 106-108 | 91-94   |
| 1:8  | 均值 (%) | 118     | 101     |
|      | 范围 (%) | 109-127 | 88-113  |
| 1:16 | 均值 (%) | 113     | 116     |
|      | 范围 (%) | 108-118 | 115-117 |

## 9.7 特异性

本试剂盒特异性识别天然和重组人CEACAM8/CD66b。



## 十：参考文献

- 1.F Buchegger. et al. (1984). Int J Cancer. 33(5):643-649.
- 2.Linshu Zhao. et al. (2004). Br J Haematol. 125(5):666-673.
- 3.M Kuroki. et al. (2001). J Leukoc Biol. 70(4):543-550.
- 4.S Oikawa. et al. (1991). J Biol Chem. 266(13):7995-8001.
- 5.T Yamanka. et al. (1996). Biochem Biophys Res Commun.219(3):842-847.